

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



09/530363 EAJU

REC'D 23 NOV 1998

WIPC

PCT

# BREVET D'INVENTION

**CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION****COPIE OFFICIELLE****PRIORITY  
DOCUMENT**SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le **13 OCT. 1998**Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets**Martine PLANCHE****INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE****SIEGE**  
26 bis, rue de Saint Petersburg  
75800 PARIS Cédex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04  
Télécopie : 01 42 93 59 30

1-80

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**REQUÊTE EN DÉLIVRANCE**

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : (1) 42.94.52.52 Télécopie : (1) 42.93.59.30

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

Réservé à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES **30 OCT. 1997**  
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL **97 13656 -**  
DÉPARTEMENT DE DÉPÔT **75**  
DATE DE DÉPÔT **30 OCT. 1997**

1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE  
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

Cabinet ARMENGAUD AINE

3, Avenue Bugeaud

75116 PARIS

n° du pouvoir permanent références du correspondant téléphone

**59197**

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

☒ brevet d'invention

☐ demande divisionnaire

☐ certificat d'utilité

☐ transformation d'une demande  
de brevet européen

☐ demande initiale

☐ brevet d'invention

☐ certificat d'utilité n°

date

Établissement du rapport de recherche

☐ différé

☒ immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance

☐ oui

☒ non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

**Méthode de diagnostic in vitro de pathologies associées à des remaniements géniques  
et trousse de diagnostic"**

3 DEMANDEUR (S)

n° SIREN

code APE-NAF

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

Monsieur GABERT Jean

Forme juridique

Nationalité (s) Française

Adresse (s) complète (s)

70 Chemin du Lancier

13008 MARSEILLE

Pays

FRANCE

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs

☒ oui

☐ non

Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES

☐ requise pour la 1ère fois

☐ requise antérieurement au dépôt : joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE

pays d'origine

numéro

date de dépôt

nature de la demande

7 DIVISIONS antérieures à la présente demande n°

date

n°

date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE

(nom et qualité du signataire - n° d'inscription)

Mandataire : PEAUCELLE Chantal

n° 92-1189

*Chantal Peaucelle*

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRES ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

*[Signature]*

# DOCUMENT COMPORTANT DES MODIFICATIONS

PAGE(S) DE LA DESCRIPTION OU DES REVENDI- CATIONS OU PLANCHE(S) DE DESSIN			R.M.*	DATE DE LA CORRESPONDANCE	TAMPON DATEUR DU CORRECTEUR
Modifiée(s)	Supprimée(s)	Ajoutée(s)			
34			X	9. 01. 98	13 JAN. 1998 - SR

Un changement apporté à la rédaction des revendications d'origine, sauf si celui-ci découle des dispositions de l'article 28 du décret du 19 septembre 1979, est signalé par la mention "R.M." (revendications modifiées).

Méthode de diagnostic in vitro de pathologies associées à des remaniements géniques et trousse de diagnostic.

L'invention se rapporte à la détection de remaniements géniques, avec échange de matériel génétique. Ces remaniements correspondent à la formation de gènes de fusion par accolement de la partie transloquée à une portion du génome située sur le chromosome partenaire, ou une modification de la régulation de l'expression d'un gène. Le terme gène ainsi utilisé désignera le gène impliqué dans divers remaniements alors que l'expression "partenaires de fusion" se réfèrera aux portions de génome accolées audit gène.

L'invention vise plus particulièrement une méthode et des trousse pour le diagnostic in vitro de pathologies associées à de tels remaniements.

En ce qui concerne par exemple les leucémies, on sait qu'elles sont associées aux remaniements de nombreux gènes dont certains, tels que le gène MLL, interviennent de manière récurrente.

Le gène MLL appartient à la bande 11q23 du génome humain, fréquemment impliquée dans des remaniements moléculaires, en particulier dans le cadre des leucémies aiguës lymphoïdes (LAL) et également de leucémies aiguës myéloïdes (LAM). Les études

cytogénétiques effectuées ont permis de dénombrer à ce jour une trentaine de bandes chromosomiques partenaires différentes. Treize partenaires de fusion de MLL ont été actuellement clonés et séquencés, ce qui représente  
5 approximativement 95 % des remaniements connus.

Ces remaniements sont le plus souvent associés à de mauvais pronostics cliniques, d'où l'importance accordée à leur étude depuis quelques années.

La cytogénique, avec l'établissement du  
10 caryotype, correspond à l'une des méthodes classiquement utilisées. Cette technique a permis de montrer l'existence de remaniements avec un grand nombre de partenaires dans la région chromosomique 11q23 et d'établir la valeur pronostique de l'anomalie. Mais elle  
15 comporte de nombreux faux négatifs et son taux de réussite n'excède pas 50 à 70 %.

D'autres techniques connues comprennent le Southern blot et l'hybridation *in situ*.

Le Southern blot présente l'avantage de mettre  
20 en évidence tous les remaniements, mais reste peu exploitable par les laboratoires cliniques du fait de sa longueur et de sa lourdeur, et des contraintes de la radioactivité. En effet, un résultat en quelques semaines, au cas par cas, est indispensable pour une  
25 décision thérapeutique.

L'hybridation *in situ* (FISH) pourrait a priori permettre de mettre en évidence des anomalies génétiques, mais sa sensibilité n'est pas toujours suffisante du fait de la fréquence des délétions qui accompagnent souvent

les translocations, l'application de cette technique peut également conduire à l'établissement de faux négatifs.

Les problèmes soulevés par ces deux types de démarche expliquent l'importance prise par  
5 l'amplification par PCR.

Cette technique permet en effet de mettre en évidence la présence d'un remaniement avec un partenaire particulier. Mais, dans sa réalisation actuelle, elle ne permet de détecter que le remaniement le plus fréquent et  
10 n'est pas applicable pour l'ensemble des partenaires, car le test deviendrait alors très lourd et consommerait beaucoup trop de matériel du patient.

Récemment, on a proposé une technique de PCR multiplex, qui permet la mise en évidence de 4 à 6  
15 partenaires, voire plus. Il s'agit cependant d'une technique délicate, dont la difficulté augmente avec le nombre de partenaires à tester et qui, de plus, nécessite un appareillage très cher (séquenceur automatique avec plusieurs marqueurs fluorescents), ce qui limite sa  
20 diffusion à quelques laboratoires experts.

La solution apportée par l'invention repose sur la réalisation d'une PCR ancrée, c'est-à-dire avec un couple unique d'amorces, permettant d'amplifier sans discrimination tous les types de gènes de fusion  
25 impliquant le gène visé, et la révélation spécifique des seuls gènes de fusion. L'ensemble des types de gènes de fusion peut être amplifié et détecté selon un protocole simple et rapide d'exécution.

L'invention a donc pour but de fournir une méthode de diagnostic in vitro de pathologies associées aux remaniements de gènes, permettant de détecter de tels remaniements et pouvant être réalisée sur la quasi-totalité des patients.

Elle vise également à fournir des troussees de diagnostic pour la mise en oeuvre de cette méthode.

La méthode de diagnostic in vitro, selon l'invention, est caractérisée en ce qu'on soumet de l'ADN d'un patient à au moins une étape de PCR ancrée, en effectuant au moins une étape d'amplification asymétrique, à l'aide d'un seul couple d'amorces formé par une amorce spécifique de l'ADN du gène susceptible d'être impliqué dans un gène de fusion et par une amorce complémentaire aléatoire, et qu'on ne révèle un tel gène que dans la mesure où il est impliqué dans ladite fusion.

On observera que ces dispositions permettent avantageusement d'amplifier toute séquence impliquant le gène considéré, quel que soit le partenaire de fusion, et même si la séquence associée au gène considéré présente une longueur importante. L'étape de révélation est au contraire spécifique et ne permet de détecter le gène considéré que dans la mesure où il est remanié avec un partenaire donné.

Les amorces utilisées dans l'étape d'amplification sont avantageusement choisies, en particulier pour l'amplification de long fragments, de manière à satisfaire les critères de longueur,  $T_m$  et de stabilité aux extrémités.

Ainsi, la longueur des amorces doit assurer une stabilité permettant l'élongation. Des amorces avantageuses comportent 25 à 40 nucléotides environ, et notamment de 30 à 35 nucléotides.

5 La température  $T_m$ , à laquelle la moitié de l'ADN est sous forme dénaturée, est avantageusement de l'ordre de 75 à 85°C, et notamment voisine de 80°C. La composition en bases de la séquence est choisie de manière à satisfaire cette exigence.

10 De même, on prendra en compte la stabilité aux extrémités 3' et 5', l'extrémité de l'amorce qui subit l'élongation devant être moins stable que l'extrémité opposée, pour éviter l'initiation et l'élongation de produits de PCR non spécifiques. Il est également  
15 important d'éviter la formation de duplex et de boucles en 3', qui gêneraient le bon appariement des amorces à la séquence d'ADN ou d'ADNc

L'élaboration d'amorces telles que définies ci-dessus peut être aisément réalisée à l'aide de logiciels.

20 La stratégie de PCR ancrée peut être dirigée en 3' comme défini ci-dessus, mais également en 5', une queue artificielle étant alors rajoutée à l'extrémité 5' du gène, utilisable comme amorce. On a recours avec  
25 avantage, à cet effet, à l'enzyme terminal déoxyribonucléotidyltransférase.

La révélation des gènes remaniés est effectuée par tout marquage approprié.

De manière générale, on met en contact des sondes spécifiques des séquences nucléotidiques de partenaires de fusion connus avec les produits de PCR dénaturés, marqués aux fins de révélation, dans des conditions permettant une interaction spécifique sondes-  
5 produits de PCR lorsqu'il existe une complémentarité des bases.

Les produits de PCR portent un marqueur (digoxigénine, biotine ou fluorophore par exemple) qui va  
10 permettre leur révélation. Ce marqueur est porté par un désoxynucléotide qui est incorporé aux produits PCR pendant la deuxième amplification.

Les sondes peuvent être fixées de façon covalente sur un support, tel que des plaques à 96 puits.  
15 Cette fixation covalente peut être réalisée avantageusement par le couplage sonde biotinylée/plaque-streptavidine.

En variante, cette liaison covalente peut être réalisée à l'aide d'une sonde phosphorylée à son  
20 extrémité et un groupement carbodiimide sur la plaque ou encore une sonde modifiée par un groupement amine à une extrémité et liée par des groupements N-oxysuccinimide esters.

Une méthode satisfaisante comprend  
25 l'utilisation de la technique ELISA pour révéler spécifiquement celles des séquences nucléotidiques qui comportent le gène impliqué dans un remaniement.

On fait réagir les produits de PCR, dans lesquels on a incorporé un marqueur, avec un anticorps

lui-même marqué, dirigé contre les marqueurs des produits de PCR, dans des conditions permettant une réaction de type antigène-anticorps, la révélation de la réaction antigène-anticorps, lorsqu'elle se produit, étant effectuée par détection du marqueur de l'anticorps ou d'une réaction l'impliquant.

Selon encore une autre méthode, on a recours à la technologie de PCR Taq Man qui permet de détecter des produits de PCR par hybridation sonde interne-produit de PCR en solution.

On observera que la mise en oeuvre de PCR multiples, avec différents gènes, permet, en marquant ces derniers avec des marqueurs distincts les uns des autres, de révéler dans un même test plusieurs gènes remaniés impliqués dans une pathologie.

Une variante de révélation, permettant de mettre en évidence, dans un même test, de nombreux remaniements géniques sur un grand nombre de gènes, est basée sur la technique des puces à ADN et comprend l'utilisation de sondes oligonucléotidiques fixées sur un support miniaturisé.

L'ADN soumis à amplification correspond avantageusement à l'ADNc, tel qu'obtenu par transcription inverse de l'ARN extrait de l'échantillon. En variante, il s'agit d'ADN génomique extrait de l'échantillon à étudier.

Selon un mode de mise en oeuvre de l'invention, on procède à une étape de transcription inverse (RT en abrégé), avant l'amplification par PCR, afin de

synthétiser une population d'ADNc à partir des ARN des cellules de l'échantillon à étudier.

Pour cette étape, on utilise avantageusement une séquence de nucléotides stable, dont le  $T_m$  est de l'ordre de 80 à 90°C.

Des séquences appropriées comprennent une cassette de 40 à 60 nucléotides environ et comportent à l'une des extrémités de 10 à 20 motifs T ou, en variante, une répétition d'un motif nucléotidique au hasard.

Selon un autre mode de mise en oeuvre de l'invention, on soumet l'ADN génomique ou l'ARN, extraits des cellules de l'échantillon à étudier, à l'action d'un composé capable d'inciser ou de bloquer spécifiquement l'ADN du gène dont on étudie la fusion. Il s'agit par exemple de PNA (acides nucléiques polypeptidiques) ou de ribozymes. On effectue ensuite les étapes de PCR, ou le cas échéant de RT-PCR avec des amorces comportant des sites de clonage. Ensuite on fait réagir les produits obtenus avec d'une part deux sondes spécifiques du gène à étudier, une en amont de la région des points de cassure (sonde «a») et une en aval (sonde «b»), d'autre part des sondes élaborées à partir des gènes partenaires connus (sondes «c»). Une détection positive avec la sonde «a» et négative avec la sonde «b» permet de conclure au réarrangement du gène considéré et une révélation négative avec les sondes «c» à l'absence de détection d'un produit de fusion connu. Les nouveaux gènes de fusion, lorsqu'ils sont mis en évidence par le test,

peuvent être secondairement clonés et séquencés par les techniques classiques.

Cette technique apporte ainsi des éléments dans la compréhension des événements moléculaires impliqués dans la transformation cellulaire.

Selon un mode avantageux de réalisation de l'invention, mis en oeuvre pour détecter des translocations impliquant le gène MLL, on synthétise par RT un pool d'ADNc à partir de l'ARN extrait de l'échantillon à étudier à l'aide d'amorces comportant une cassette d'environ 30 à 35 nucléotides, complétée par une séquence de 6 ou 9 motifs nucléotidiques au hasard, et on réalise une PCR ancrée avec, comme amorce sens spécifique, une amorce située sur l'exon 5 de MLL. Lorsqu'on a recours à un deuxième tour d'amplification, on utilise une amorce sens interne par rapport à la première, ce qui permet d'augmenter la spécificité. L'amorce aléatoire est avantageusement complémentaire de la cassette d'oligonucléotides utilisée lors de l'étape de transcription inverse.

La révélation des transcrits de fusion éventuellement présents est réalisée selon la technique ELISA et comprend l'utilisation de sondes situées à intervalles réguliers sur les partenaires de fusion considérés, de façon à couvrir la totalité des points de cassure.

Une première étape consiste à mettre en contact une sonde spécifique des partenaires de fusion connus de MLL avec les produits de PCR dénaturés, marqués par de la

digoxygénine lors du deuxième tour de l'amplification, dans des conditions permettant une hybridation lorsqu'il existe une complémentarité de bases,

Dans une deuxième étape, on met ensuite en contact les produits résultants avec des anticorps anti-digoxygénine, ces anticorps étant couplés à une enzyme, capable de réagir avec son substrat en libérant un produit coloré détectable dans le cas où les anticorps sont fixés aux produits de PCR.

Des résultats satisfaisants sont obtenus en réalisant l'hybridation entre 37 à 50 °C environ pendant 2 à 4 heures.

L'interaction sondes-produits de PCR est réalisée à une température supérieure à 30°C, notamment de 35 à 65°C, en particulier de 37°C environ, pendant une durée de 1 h à 6 h, notamment de 3 h environ.

Les conditions de lavage sont choisies de manière à obtenir un rapport signal/bruit de fond optimal.

On fait réagir le substrat de l'enzyme avec le mélange réactionnel sondes/produits de PCR dans les mêmes conditions de durée et de température, et on détecte le produit éventuellement libéré, par exemple par mesure de densité optique.

Les résultats obtenus à l'aide de cette méthode montrent que les produits de fusion des translocations considérées sont détectés aisément, avec des signaux forts. Ces résultats sont aisément interprétables par rapport aux contrôles négatifs.

Il est ainsi possible de détecter 95 % des remaniements du gène MLL.

Pour détecter de nouvelles associations MLL-gène partenaire, on soumet les ARN totaux à l'action de ribozymes spécifiques du gène MLL avant de procéder à la RT-PCR, puis on fait réagir les produits d'amplification avec une sonde correspondant à une séquence de l'exon 5 de MLL, en 3' de l'amorce utilisée, puis avec une deuxième sonde toujours spécifique du gène MLL située entre les points de cassure et le site d'action des ribozymes et enfin avec des sondes des partenaires connus. L'obtention d'un signal positif dans le premier cas et négatif avec la sonde est significatif d'un réarrangement de MLL, alors qu'un signal négatif dans la troisième étape indique qu'aucun produit de fusion connu n'a été détecté. On procède alors à la mise en évidence d'un nouveau gène de fusion.

En variante, la recherche de partenaires inconnus peut être réalisée en mettant en oeuvre les étapes de PCR, et le cas échéant de RT-PCR, décrites ci-dessus, et en révélant les produits de PCR à l'aide de puces d'ADN formées de sondes oligonucléotidiques fixées sur une surface miniaturisée.

L'invention vise également des trousse de diagnostic pour la mise en oeuvre de la méthode définie ci-dessus.

Ces trousse sont caractérisées en ce qu'elles comportent les réactifs nécessaires pour la réalisation d'au moins une PCR et du test de révélation, et le cas

échéant de la transcription inverse et/ou de la réaction avec les agents capables d'inciser ou de bloquer spécifiquement le gène dont on étudie le remaniement, tels que les ribozymes ou les PNA.

5           En particulier, ces troussees comportent les amorces pour ces différentes réactions et avantageusement les solvants ou tampons appropriés pour leur réalisation, notamment pour l'hybridation et les lavages, ainsi qu'une notice d'utilisation.

10           Des troussees préférées renferment les sondes spécifiques de partenaires de fusion fixées à un support. Ces sondes sont par exemple fixées sur une plaque et sont telles qu'obtenues par couplage d'un réactif qu'elles comportent à l'une de leurs extrémités avec un réactif de  
15 la plaque. Il s'agit par exemple de sondes biotinylées en 5' fixées sur de la streptavidine recouvrant le fonds des puits d'une microplaque.

          En variante, on utilise des sondes oligonucléotidiques fixées sur un support miniaturisé  
20 (puces à ADN)

          La possibilité de stocker ces plaques-support sur lesquelles sont fixées les sondes permet de standardiser la technique de révélation et de l'alléger pour la révélation des gènes de fusion ou des transcrits  
25 de fusion recherchés.

          Les expérimentations menées sur des lignées cellulaires ont été validées chez des patients dont le type de remaniement génétique avait déjà été établi, confirmant leur intérêt pour une utilisation dans un

cadre clinique pour l'établissement d'un diagnostic moléculaire ainsi que pour la définition des points de cassure.

On mesurera l'intérêt particulier de la méthode de l'invention dans les cas, notamment de LAM, où l'étude cytogénétique ne révèle pas d'anomalies chromosomiques, alors que la biologie moléculaire permet de mettre en oeuvre un remaniement moléculaire. La méthode de l'invention permet ainsi de cribler les patients atteints de LAM et pour lesquels le caryotype n'est pas disponible ou a été décrit comme normal, et de vérifier l'existence ou non de remaniements associés à une pathologie.

L'invention trouve donc un intérêt particulier pour le diagnostic des leucémies.

Elle s'avère également tout spécialement utile en cancérologie. On citera en particulier le diagnostic de tumeurs solides, et tout spécialement de remaniements du gène EWS dans les tumeurs d'Ewing. L'application de la méthode de l'invention permet de détecter des remaniements EWS/FLI1 ou d'autres membres de la famille du gène ETS, tels que les gènes ERG, ETV1 ou E1AF.

De manière générale, l'invention fournit ainsi les moyens pour un diagnostic simple, fiable et de grande sensibilité, sur un grand nombre d'échantillons. L'amplification du matériel de départ revêt également un grand intérêt puisqu'il s'agit de prélèvements effectués sur les patients, notamment sang ou moelle osseuse. On peut tester un grand nombre de sondes, par exemple, jusqu'à 500 sondes environ sur les plaques 96 puits.

On notera avec intérêt que les dispositions de l'invention permettent une automatisation des tests, notamment à l'étape de révélation.

De plus, comme déjà souligné, l'invention  
5 fournit les moyens de détecter des gènes qui jusqu'alors n'avaient pas été identifiés comme impliqués dans une pathologie donnée.

D'autres caractéristiques et avantages de  
10 l'invention seront donnés dans les exemples qui suivent.

Exemple 1 : Protocole pour la détection de remaniements d'un gène avec des partenaires de fusion connus.

A partir des ARN de l'échantillon à étudier, on  
15 synthétise les ADNc par transcription inverse (RT), puis on amplifie le pool d'ADNc par PCR et on procède à la vérification de la spécificité des transcrits.

#### 1. Préparation des ARN

Les cellules de l'échantillon à étudier sont  
20 mises en solution de lyse par addition de Trizol<sup>R</sup> (Life Technologie). On ajoute ensuite du chloroforme (20% final) au lysat cellulaire obtenu, puis après 5 min d'incubation à température ambiante, le tout est centrifugé 15 min à 4°C et 12000 g.

25 On obtient trois phases, à savoir une phase incolore aqueuse renfermant l'ARN, une phase intermédiaire blanchâtre renfermant l'ADN, et une phase organique phénolée rouge.

On ajoute de l'isopropanol à l'ARN, (500  $\mu$ l pour 1 ml de Trizol<sup>R</sup>), puis on centrifuge 10 min à 4°C et 12000 g, après une incubation de 10 min à température ambiante ; le précipité est rincé dans 1 ml d'éthanol 75% (5 min à 4°C et 7500 g).

Le précipité est séché à température ambiante avant d'être repris dans 10  $\mu$ l d'eau et traité par la RNase H.

La quantité d'ARN extrait est calculée par mesure de la DO à 260 nm : concentration ( $\mu$ g/ $\mu$ l) = DO mesurée x 40 (coefficient d'extinction) x coefficient de dilution x  $10^{-3}$ .

## 2. Transcription inverse

On utilise, comme système enzymatique Superscript<sup>R</sup> (Life Technologie, 18064-014) ou Expand Reverse Transcrip-tase<sup>R</sup> (Boehringer, 1 785 834), en appliquant le protocole suivant :

1  $\mu$ g d'ARN est soumis à dénaturation (volume de 9,5  $\mu$ l) 10 min à 70°C, puis ajouté au mélange réactionnel (10,5  $\mu$ l): nucléotides (1 mM) + dTT (10mM) + amorce 0,5  $\mu$ M) + inhibiteurs des RNases (20 unités) + enzyme (50 unités d'Expand Reverse Transcriptase<sup>R</sup>, 200 unités de Superscript)<sup>R</sup>, le tout dans un tampon approprié à chacun des deux systèmes enzymatiques :

Superscript<sup>R</sup> : 20 mM Tris HCl, 50 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>

Expand Reverse Transcriptase<sup>R</sup> : 50 mM Tris HCl, 40 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>.

La synthèse des ADNc se fait selon le cycle : 10 min à 20°C / 45 min à 42°C / 3 min à 99°C.

Les échantillons sont ensuite soumis à la RNase H (Boehringer, 786 357 : 2 unités) pendant 10 min, à 42°C.

Les ADNc sont repris dans un volume final de 60 µl (dilution au 1/3) et stockés à -20°C.

### 3 Amplification des ADNc par PCR

On rapporte les résultats obtenus avec, comme systèmes enzymatiques,  $\alpha$ LONGASE<sup>R</sup> (BRL, 10481-018) et Expand Long template PCR System (Boehringer, 175 9060).

On utilise deux programmes d'amplification différents selon la longueur des fragments :

- pour l'amplification de fragments allant jusqu'à 1 kb:

94°C	3 min		
94°C	30 sec		
58°C	30 sec		x 34
72°C	30 sec		
16°C	∞		

- pour l'amplification de fragments supérieurs à 1kb

95°C	30 sec	
94°C	10 sec / 68°C	8 min x 10
94°C	10 sec / 68°C	8 min + 20 sec par cycle x20
68°C	7 min	
16°C	∞	

La réaction s'effectue dans chaque cas dans un volume de 50 µl en respectant les conditions suivantes : dXTP (500 µM), amorces sens et antisens (1 µM), MgCl<sub>2</sub> (3 mM), enzymes (2,5 unités), le tout dans un tampon 50 mM Tris HCl (pH 9,2), 16 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2% DMSO, 0,1% Tween 20.

Un deuxième tour d'amplification est effectué lors de l'étude de longs fragments, à partir d'1  $\mu$ l de produit de la première PCR. On utilise alors une amorce sens interne par rapport à celle du premier tour, l'amorce antisens est identique ; en vue de la révélation par ELISA, le dTTP est remplacé par un mélange dTTP + DIG-dUTP<sup>R</sup> (Boehringer ; 1558 706) respectant les proportions 1 :19.

4. Révélation par ELISA (kit Boehringer, 1636 111)  
des hybrides sondes/produits de PCR.

Dans une première étape, on met en contact des sondes biotinylées spécifiques de partenaires connus avec les produits de PCR et dans une deuxième étape on révèle les hybrides formés.

a. hybridation

A l'aide du logiciel oligo 5, on choisit les sondes sur les séquences des différents partenaires, juste en aval des points de cassure décrits dans chacune des translocations. Les sondes sont alors biotinylées en 5' et purifiées par HPLC.

- *fixation extemporanée des sondes sur les plaques ELISA*

10  $\mu$ l de produits de PCR sont dénaturés dans 10  $\mu$ l de solution alcaline, puis déposés dans un puits avec un revêtement de streptavidine, en présence de la sonde

biotinylée à 7,5 pmol/ml (volume final de 220  $\mu$ l). La réaction d'hybridation se fait entre 37 et 50°C, pendant trois heures et sous agitation.

Après trois lavages, l'anticorps anti-DIG couplé à la peroxydase est ajouté (2 mU dans un volume de 200  $\mu$ l) ; l'incubation est de 30 min à 37°C. On procède ensuite à une série de trois lavages.

Enfin, le substrat de la peroxydase est à son tour ajouté à raison de 1 mg/ml (30 min à 37°C). La DO est lue à 405 nm contre 492 nm.

- *fixation préalable des sondes biotinylées aux plaques ELISA* (d'après R. Giorda et col., 14) :

100  $\mu$ l (par puits) de solution de sonde à 0,75 pmol/ $\mu$ l sont incubés 2 heures à température ambiante, sous agitation.

Après lavage, 100 $\mu$ l de solution 5x Denhardt's / 0,02% Na azide sont déposés dans chacun des puits.

Les plaques peuvent ainsi être stockées à 4°C et utilisées au fur et à mesure des manipulations : il suffit de les laver (trois fois), puis de déposer les produits de PCR dénaturés dans 100 $\mu$ l de tampon d'hybridation ; la suite du protocole se fait comme décrit ci-dessus.

Exemple 2 : Protocole pour la détection de remaniements d'un gène avec des partenaires de fusion inconnus.

On traite tout d'abord les ARN totaux extraits des cellules de l'échantillon à étudier par les ribozomes en opérant comme suit : 2  $\mu$ g d'ARN sont mis en présence  
5 des ribozymes (1  $\mu$ M) dans un tampon :  $MgCl_2$  (20 mM) ; Tris HCl pH 8 (50 mM), le tout dans un volume de 10  $\mu$ l ; le mélange réactionnel est incubé 2 heures à 37°C.

Les produits de réaction sont récupérés par précipitation  
10 avec de l'alcool absolu (2,5 volumes), en présence de glycogène et d'acétate de sodium (0,3 M final) : 30 min dans la glace puis 30 min à 14000 g, 4°C; après rinçage avec de l'alcool 75 % (20 min à 14000 g, 4°C) les précipités sont repris dans 10  $\mu$ l d'eau et soumis aux  
15 réactions de RT et de PCR selon l'invention.

Exemple 3 : Détection de remaniements du gène  
MLL

. translocations de MLL

20 On rappelle dans le tableau 1 la caractérisation des translocations impliquant MLL et des partenaires de fusion telle qu'établie à ce jour.

anomalie cytogénétique*	partenaire de fusion	taille de la région codante du partenaire	type de leucémie	Références bibliographiques
t(1;11)(p32;q23)	AF-1p = eps 15 (substrat de l'EGF R)	2,8 kb	LAM	O. Bernard et col. (1994) ; 7
t(1;11)(q21;q23)	AF-1q = cytokine ou facteur de croissance	1,6kb	LAM	W. Tse et col. (1995) ; 8
t(4;11)(q21;q23)*	AF4	3,5 kb	LAL	Y. Gu et col. (1992) ; 9
t(6;11)(q27;q23)*	AF6	4,8 kb	LAL-T ou LAM	R. Prasad et col. (1993) ; 10
t(6;11)*	AF6 q2 (famille Forhead)	ND	SMD°	O. Bernard et col. (sous presse)
t(9;11)(p22;q23)	AF9	3,4 kb	LAM	T. Nakamura et col. (1993) ; 11
t(10;11)(p12;q23)	AF10	3,8 kb	LAM	T. Chaplin et col. (1995) ; 12
t(11;17)(q23;q21)	AF17	3,3 kb	LAM	R. Prasad et col. (1994) ; 13
t(11;19)(q23;p13.1)	ELL = facteur d'élongation de la RNA pol II	2,7kb	LAM	M. Thirman et col. (1994) ; 14
t(11;19)(q23;p13)	ENL = facteur de transcription	1,6 kb	LAL	D. Tkachuk et col. (1992) ; 5
t(11;19)(q23;p13)*	EEN (domaine d'homologie (SH3 à Src)	1,4 kb	LAM	C.W. So et col. (1997) ; 15
t(X;11)(q13;q23)	AFX1 (famille Forkhead)	3,2 kb	LAM	J. Corral et col. (1993) ; 16
(+ 11)*	MLL lui même (duplication)	12 kb	LAL	S. Schichman et col. (1994) ; 17
t(11;16)(q23;p13)	CBP	7 Kb	SMD/LAM	T. Taki et al (1997) ; 18

\* : le caryotype peut être normal, sans aucune anomalie 11q23

AF10 ; AF 17 : motifs de dimérisation ; doigts de Zinc

AF4 ; AF9, ENL : signal de localisation nucléaire et séquences riches en sérines et prolines

SMD° : syndrome myélodisphasique

Les différents travaux menés sur MLL et ses partenaires ont permis d'établir les faits suivants :

1. Seule la protéine chimère obtenue par fusion de la partie NH<sub>2</sub> de MLL avec l'extrémité C terminale du partenaire semble avoir un rôle dans la tumorigénèse.

2. Malgré l'hétérogénéité des points de cassure de MLL, ceux-ci sont tous répartis entre l'exon 5 et l'exon 11 du gène ; les protéines de fusion formées sont alors homologues pour leur partie NH<sub>2</sub>, du fait de la conservation de motifs propres à MLL.

3. Il existe un très grand nombre de partenaires : au moins autant que pour les Ig ou les TCR dans le cadre des LAL, les partenaires connus représentant plus de 95 % des translocations de MLL rapportées à ce jour. Ces partenaires ne présentent pas de réelle homologie structurale ; seuls AF9, AF4 et ENL sont homologues et AF10 et AF17 semblent appartenir à une nouvelle famille génique. MLL peut se trouver associé à lui-même dans un processus de duplication.

#### . étude de cellules LAM

On rapporte ci-après les résultats obtenus avec des cellules de lignées leucémiques (LAM humaine) dont l'analyse cytogénétique révèle en particulier des réarrangements 11q23/6q27. La lignée peut donc servir de contrôle positif pour la translocation t(6 ;11).

Il s'agit de cellules de la lignée ML-2 (DSM ACC15) qui ont été cultivées en milieu RPMI (90%) + SVF

(10%). En fin de culture, les cellules ont été congelées dans DMSO ( $5.10^6$ /ml) pour être stockées, ou mises en solution de lyse (Trizol<sup>R</sup>) en vue d'en extraire les acides nucléiques.

5           La lignée TF1 (dérivée d'un patient érythroleucémique sans anomalie 11q23) a été utilisée en tant que contrôle, à différentes étapes des manipulations (T. Kitamura et al, 14.).

10           Les ARN sont extraits des cellules en opérant comme indiqué ci-dessus et soumis à l'action de la RNase H.

. transcription inverse

15           On opère comme décrit dans l'exemple 1 en utilisant une amorce avec une répétition de 9 motifs au hasard, de séquence : 5'

CGTCGTCGTG AATTCCTAGA TCTTCTAGAT ATGTTNNNNN NNNN

(SEQ ID N° 2, 44 nucléotides,  $T_m = 84^\circ\text{C}$ ).

20

. amplification

L'amplification est réalisée comme décrit dans l'exemple 1, en utilisant comme amorces sens

25           - au premier tour, une amorce de séquence

AGCCCAAGTT TGGTGGTCGC AATATAAAGA AG

(SEQ ID N° 3, 32 nucléotides,  $T_m = 84^\circ\text{C}$ ), et

30

- au deuxième tour, une amorce interne de séquence

GCCGAATTCA TGCCTTCCAA AGCCTACCT

(SEQ ID N° 4, 29 nucléotides,  $T_m = 86^\circ\text{C}$ ), et  
comme amorce aléatoire, une amorce de séquence

CGTCGTCGTG AATTCCTAGA TCTTCTAGAT ATGTT

(SEQ ID N° 5, 35 nucléotides,  $T_m = 81^\circ\text{C}$ ).

. révélation

- hybridation

Pour chacun des partenaires de MLL, une sonde spécifique a été définie, en aval du point de cassure du contrôle positif correspondant. Le rapport signal/bruit de fond obtenu lors de l'ELISA traduit l'efficacité de révélation de chacune des sondes. Pour ENL et la duplication, la première valeur du rapport correspond à un lavage avec la solution non diluée alors que la seconde a été obtenue avec une solution diluée au 1/2.

Les sondes biotinylées utilisées sont caractérisées dans le tableau 2 suivant :

Tableau 2

sonde	$T_m$ en $^\circ\text{C}$	( $-\Delta G$ ) moyen)	signal/bruit de fond
ENL1	69	inférieur à 8	2,8
ENL2	79	inférieur à 8	1,6 - 3
ELL	76	supérieur à 8	5,7
AF 10.3	77,5	égal à 8	3,6
AF4	80	supérieur à 8	6,6
AF6	74	égal à 8	3,7
AF9	73	égal à 8	3,9
duplication	81	supérieur à 8	2,5 - 8

- mesure de la DO

On mesure les DO pour chaque transcrit de fusion. Les résultats obtenus montrent que les différents  
5 partenaires sont détectés. L'obtention de signaux forts permet d'interpréter aisément les résultats par rapport aux contrôles négatifs.

De plus l'utilisation de sondes définies en aval des points de cassures rapportés dans la littérature  
10 permet de situer l'évènement moléculaire sur le gène impliqué.

- détection de nouveaux partenaires

On soumet les ARN du contrôle positif de la t(9;11) lignée Monomac 6) et ceux de la lignée TF1 à  
15 l'action de ribozymes.

On utilise deux ribozymes dont l'action enzymatique est spécifique du gène MLL non modifié, leurs sites de coupure se situant en aval de la région des points de cassure. Ces ribozymes présentent  
20 respectivement les séquences suivantes :

- ribozyme 1 : CUCCAGCUGA UGAGUCCGUG AGGACGAAAC CUUUGG  
(SEQ ID N° 6)

25 - ribozyme 2 : CUGGAAUCUG AUGAGUCCGU GAGGACGAAA UUUUCUUC  
(SEQ ID N° 7).

Les séquences soulignées correspondent aux séquences complémentaires de celles de MLL autour des points de clivage, et les séquences non soulignées aux  
30 séquences non appariées aboutissant à la formation de

structures secondaires indispensables à l'activité catalytique des ribozymes. Le clivage se fait en 3' du nucléotide qui suit l'uracile complémentaire de l'adénine soulignée.

5 Les produits de réactions ont été convertis en ADNc, puis soumis à l'amplification à l'aide d'un couple d'amorces situées de part et d'autre des points de coupure.

10 L'invention fournit ainsi des outils moléculaires et une méthode de diagnostic permettant d'identifier sur un grand nombre de patients les différents partenaires de MLL ainsi que leurs différents points de cassure et de mieux appréhender les mécanismes de développement de pathologies liées aux remaniements de  
15 gène, par exemple les mécanismes de leucémogénèse sous-jacents aux remaniements du gène MLL.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Bernard OA et al, Oncogene 1994 ; 9:1039-1045.
- 5 2. Tse et al, Blood 1995 ; 85:650-656.
3. Gu Y. et al, Cell 1992; 71:701-708.
4. Prasad R et al, Cancer research 1993; 53; 5624-5628.
5. Bernard OA et al, (sous presse).
6. Nakamura T et al, P.N.A.S. USA 1993; 90 4631-4635.
- 10 7. Chaplin T et al, Blood 1995 ; 85 : 1435-1441.
8. Prasad R et al, P.N.A.S. USA 1994; 91: 8107-8111.
9. Thirman MJ et al, P.N.A.S. USA 1994 ; 91:12110-12114.
10. Tkachuk DC et al, Cell 1992 ; 71:691-700.
11. So CW et al, USA 1997; P.N.A.S. 94: 2563-2568.
- 15 12. Corral J et al, P.N.A.S., USA 1993;90:8538-8542.
13. Schichman SA et al, P.N.A.S. USA 1994;91:6236-6239.
14. Kitamura T, et al, J Cell Physiol 1988 ; 140:323-334.
15. So CW et al, P.N.A.S., USA 1997 ; 94 : 2563-2568.
16. Corral et al, P.N.A.S., USA 1993 ; 90 : 8538-8542.
- 20 17. Schichman SA et al, P.N.A.S. USA 1994, 91 : 6236-6239.
18. Taki T et al, 1997, Blood 1997, vol. 89, n° 11, pp 3945-3950.

## LISTE DE SEQUENCES

## 5 (1) INFORMATIONS GENERALES:

## (i) DEPOSANT:

(A) NOM: Jean GABERT  
(B) RUE: 70 Chemin du Lancier  
10 (C) VILLE: MARSEILLE  
(E) PAYS: FRANCE  
(F) CODE POSTAL: 13008

15 (ii) TITRE DE L'INVENTION: Méthode de diagnostic in vitro de  
pathologies associées à des remaniements géniques et trousse de  
diagnostic.

20 (iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 7

## (iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:

(A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk  
(B) ORDINATEUR: IBM PC compatible  
(C) SYSTEME D'EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS  
25 (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.30

(OEB)

## 30 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 52 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
35 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

40 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID NO: 1:

CGTCGTCGTG AATTCCTAGA TCTTCTAGAT ATGTTTTTTT TTTTTTTTTT VV

52

## 45 (3) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 44 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
50 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID NO: 2:

CGTCGTCGTG AATTCCTAGA TCTTCTAGAT ATGTTNNNNN NNNN

44

(4) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 32 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID NO: 3:

AGCCCAAGTT TGGTGGTCGC AATATAAGA AG

32

(5) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 29 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID NO: 4:

GCCGAATTCA TGCCTTCCAA AGCCTACCT

29

(6) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 5:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 35 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID NO: 5:

CGTCGTCGTG AATTCCTAGA TCTTCTAGAT ATGTT

35

## (7) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 6:

5 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR: 36 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: en trèfle

10 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

15 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID NO: 6:

CUCCAGCUGA UGAGUCCGUG AGGACGAAAC CUUUGG 36

## 20 (8) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 7:

25 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR: 38 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION : en trèfle

30 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID NO: 7:

35 CUGGAAUCUG AUGAGUCCGU GAGGACGAAA UUUUCUUC 38

## REVENDECATIONS

1/ Méthode de diagnostic in vitro de pathologies associées à des remaniements géniques, caractérisée en ce qu'on soumet de l'ADN d'un patient à au moins une étape de PCR ancrée, en effectuant au moins une étape d'amplification asymétrique, à l'aide d'un seul couple d'amorces formé par une amorce spécifique de l'ADN du gène susceptible d'être impliqué dans un gène de fusion et par une amorce aléatoire, et qu'on ne révèle un tel gène que dans la mesure où il est impliqué dans ladite fusion.

2/ Méthode selon la revendication 1, caractérisée en ce que les amorces utilisées dans l'étape d'amplification comportent 25 à 40 nucléotides environ et notamment de 30 à 35 nucléotides,  $T_m$  est de l'ordre de 75 à 85°C, notamment voisine de 80°C.

3/ Méthode selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce qu'on met en contact des sondes spécifiques des séquences nucléotidiques de partenaires de fusion connus avec les produits de PCR dénaturés, marqués aux fins de révélation, dans des conditions permettant une interaction spécifique sondes-produits de PCR lorsqu'il existe une complémentarité des bases.

4/ Méthode selon la revendication 3, caractérisée en ce que la révélation est effectuée soit par marquage des produits de PCR, les sondes étant fixées à un support de façon covalente, soit par marquage des sondes en solution.

5/ Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que l'ADN soumis à amplification est l'ADNc tel qu'obtenu par transcription inverse (RT) de l'ARN extrait de l'échantillon, ou l'ADN génomique total extrait de l'échantillon à étudier.

6/ Méthode selon la revendication 5, caractérisée en ce qu'elle comprend une étape de transcription inverse avant l'étape d'amplification.

7/ Méthode selon la revendication 6, caractérisée en ce qu'on utilise comme amorces pour la transcription inverse des séquences comprenant une cassette de 40 à 60 nucléotides environ et à l'une des extrémités de 10 à 20 motifs T ou une répétition d'un motif nucléotidique au hasard, ou qu'en variante on met en oeuvre des PCR multiples, avec différents gènes, en marquant ces derniers avec des marqueurs différents les uns des autres.

8/ Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisée en ce qu'on soumet l'ADN génomique, ou l'ARN, extraits des cellules de l'échantillon à étudier, à l'action d'un composé capable d'inciser ou de bloquer spécifiquement l'ADN ou l'ARN du gène dont on étudie la fusion et, après l'étape de PCR ou RT-PCR, avec des amorces comportant des sites de clonage, les produits obtenus étant mis à réagir avec d'une part deux sondes spécifiques du gène à étudier, et plus précisément, en amont et en aval de la région susceptible d'être concernée par les points de cassure, d'autre part

des sondes élaborées à partir des gènes partenaires connus, une détection positive avec la sonde d'amont et négative avec la sonde d'aval dans le premier cas permettant de conclure au réarrangement du gène considéré, et une conclusion négative dans le deuxième cas, à l'absence de détection d'un produit de fusion connu, ou qu'en variante on fixe une pluralité de sondes sur un support miniaturisé, l'hybridation spécifique sonde-produits de PCR marqués, mettant en évidence le partenaire du gène de fusion.

9/ Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisée en ce qu'elle est appliquée à la détection de translocations impliquant le gène MLL et comprend la synthèse par RT d'un pool d'ADNc à partir de l'ARN extrait de l'échantillon à étudier, à l'aide d'amorces comportant une cassette d'environ 30 à 35 nucléotides complétée par une séquence de 6 ou 9 motifs nucléotidiques au hasard, et on réalise une PCR ancrée avec, avec comme amorce sens spécifique, une amorce située sur l'exon 5 de MLL, et lorsqu'on réalise un deuxième tour, une amorce sens interne par rapport à la première, l'amorce aléatoire étant à chaque tour la même et complémentaire de la cassette d'oligonucléotides utilisées dans l'étape de RT.

10/ Méthode selon la revendication 9, caractérisée en ce que la révélation des transcrits de fusion éventuellement présents comprend la mise en contact

- d'une sonde spécifique des partenaires de fusion connus de MLL avec les produits de PCR dénaturés, marqués par de la digoxygénine lors de l'amplification, dans des conditions permettant une hybridation lorsqu'il existe une complémentarité de bases,

- des produits résultants avec des anticorps anti-digoxygénine, ces anticorps étant couplés à une enzyme, capable de réagir avec son substrat en libérant un produit coloré détectable dans le cas où les anticorps sont fixés aux produits de PCR, puis

- du mélange réactionnel sondes/produits de PCR avec le substrat de l'enzyme, le produit éventuellement formé étant alors détecté.

11/ Méthode selon la revendication 9 ou 10, caractérisée en ce que pour détecter de nouvelles associations MLL-gène partenaire, on soumet les ARN totaux à l'action de ribozymes avant de procéder à la RT-PCR, puis on fait réagir les produits d'amplification d'une part avec une sonde correspondant à une séquence de l'exon 5 de MLL, en 3' de l'amorce utilisée, puis avec une deuxième sonde toujours spécifique du gène MLL, située entre les points de cassure et le site d'action des ribozymes, et enfin avec des sondes de partenaires connus.

12/ Application de la méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, au diagnostic de leucémies.

13/ Application de la méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, au diagnostic de tumeurs solides, telles que les tumeurs d'Ewing.

14/ Trousses de diagnostic pour la mise en oeuvre de la méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisées en ce qu'elles comportent les réactifs nécessaires pour la réalisation de la PCR et du test de révélation, et le cas échéant de la transcription inverse et/ou de la réaction avec des agents capables d'inciser ou de bloquer le gène tels les PNA ou les ribozymes, ces trousse comportant en outre les amorces pour ces différentes réactions et avantageusement les solvants ou tampons appropriés pour leur réalisation.

15/ Trousses selon la revendication 13, caractérisées en ce qu'elles comportent des sondes oligonucléotidiques pour réaliser les hybridations mises en oeuvre lors de l'étape de révélation, ces sondes étant fixées sur un support tel qu'une plaque à multipuits, et sont telles qu'obtenues par couplage d'un réactif qu'elles comportent à l'une de leurs extrémités avec un réactif de la plaque, par exemple par couplage de biotine fixée à leur extrémité 5' sur de la streptavidine recouvrant le fond des puits d'une microplaque, ou qu'en variante les sondes oligonucléotidiques sont fixées sur un support miniaturisé.

13/ Application de la méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, au diagnostic de tumeurs solides, telles que les tumeurs d'Ewing.

5 14/ Trousses de diagnostic pour la mise en oeuvre de la méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisées en ce qu'elles comportent les réactifs nécessaires pour la réalisation de la PCR et du test de révélation, et le cas échéant de la transcription inverse et/ou de la réaction avec des  
10 agents capables d'inciser ou de bloquer le gène tels les PNA ou les ribozymes, ces troussees comportant en outre les amorces pour ces différentes réactions et avantageusement les solvants ou tampons appropriés pour leur réalisation.

15 15/ Trousses selon la revendication 14, caractérisées en ce qu'elles comportent des sondes oligonucléotidiques pour réaliser les hybridations mises en oeuvre lors de l'étape de révélation, ces sondes étant fixées sur un support tel qu'une plaque à multipuits,  
20 et sont telles qu'obtenues par couplage d'un réactif qu'elles comportent à l'une de leurs extrémités avec un réactif de la plaque, par exemple par couplage de biotine fixée à leur extrémité 5' sur de la streptavidine recouvrant le fonds des puits d'une microplaque, ou qu'en  
25 variante les sondes oligonucléotidiques sont fixées sur un support miniaturisé.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**